

УДК 57.083.134:57.086.83

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА КАК КЛЮЧЕВОЙ ФАКТОР КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Трухан И.С.

*ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск,
e-mail: PREDELA@yandex.ru*

В настоящее время в науке и медицине огромное значение приобрели методы, основанные на технологии культивирования клеток животных, они нашли применение в фундаментальных исследованиях, при оценке потенциальных лекарственных средств, в производстве вакцин и биофармацевтических препаратов, а также в регенеративной медицине. Ключевым фактором, определяющим возможность поддержания стабильного роста и размножения клеток, является выбор соответствующей питательной среды. В связи с этим в статье рассмотрена современная классификация сред для культивирования клеток млекопитающих, их состав, включая основные компоненты, необходимые для поддержания жизнеспособности клеток (буферная система, углеводы, аминокислоты, витамины и неорганические соли), и дополнительные элементы, наиболее часто применяемые для поддержания активной пролиферации и предотвращения контаминации культуры (сыворотка и антибиотики). При этом в статье уделено особое внимание составу и свойствам сыворотки, выполняющей разнообразные функции и обеспечивающей клетки множеством высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений, ее роли при выращивании клеток в искусственных условиях, а также возможности культивирования клеток в бессывороточных условиях. Так как коммерческое разнообразие доступных сред (MEM, DMEM, RPMI-1640, IMDM, F-10 и F-12 Хэма), а также сывороток, факторов роста, гормонов и других активных соединений достаточно велико, это позволяет обеспечивать стабильное поддержание множества типов клеток или клеточных линий в культуре.

Ключевые слова: культура клеток млекопитающих, питательная среда, сыворотка, бессывороточная среда, DMEM, RPMI-1640, среда F-12 Хэма

THE CULTURE MEDIUM AS A KEY FACTOR OF THE MAMMALIAN CELL CULTIVATION

Trukhan I.S.

Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, e-mail: PREDELA@yandex.ru

Currently, methods based on the technology of animal cells cultivation have taken on great value in science and medicine, they are used in fundamental research, in assessment of potential drugs, in the production of vaccines and biopharmaceuticals, as well as in regenerative medicine. The key factor determining the possibility of maintaining stable cell growth and proliferation is the choice of the appropriate culture medium. Thereby the article considers current classification of mammalian cells cultivation media, their composition, including the main components necessary to maintain the cell viability (buffer system, carbohydrates, amino acids, vitamins and inorganic salts), and additional elements that are most often applied to maintain active proliferation and prevent culture contamination (serum and antibiotics). In addition, the article pays particular attention to the composition and properties of serum that performs great number of functions and provides cells with a variety of high-molecular and low-molecular compounds; it describes role of the serum in cell growth in artificial conditions, as well as the possibility of cell cultivation in the serum-free environment. Since the commercial diversity of available media (MEM, DMEM, RPMI-1640, IMDM, Ham's F-10 and F-12) as well as serums, growth factors, hormones, and other active compounds is sufficiently large it allows to provide stable maintenance of many cell types or cell lines in culture.

Keywords: mammalian cell culture, culture medium, serum, serum-free medium, DMEM, RPMI-1640, Ham's F12 medium

В настоящее время технология культивирования клеток млекопитающих стала одним из основных направлений, без которого невозможен научный прогресс в биологии, медицине и фармакологии. Изучение культур клеток животных и человека позволяют исследовать механизмы клеточного взаимодействия, дифференцировки и дедифференцировки клеток, трансдукцию сигналов, а также реакцию клеток на внешнее воздействие и многое другое. Кроме того, клеточные и тканевые культуры используют в качестве модельных систем для изучения механизмов патогенеза при различных заболеваниях, для оценки эффективности и токсичности

новых лекарственных средств, они применяются для производства вакцин и биофармацевтических препаратов, задействованы во вспомогательных репродуктивных технологиях. С каждым годом во всем мире растет популярность нового направления, регенеративной медицины, основанной на технологии культивирования клеток человека [1]. Независимо от назначения клеточной культуры, для поддержания стабильного роста и размножения клеток ключевым фактором является выбор соответствующей питательной среды, способной обеспечить клетки элементами питания, метаболитами, необходимыми для био-

синтеза, регуляторными факторами, веществами, способными выполнять защитные функции. Кроме того, культуральная среда непосредственно влияет на результаты исследований, скорость производства биофармацевтических препаратов или соответствие полученной культуры медицинским требованиям. Таким образом, целью данной статьи является обзор наиболее часто применяемых питательных сред, их классификации, состава и необходимости внесения дополнительных компонентов для создания оптимальных условий при культивировании клеток млекопитающих.

Классификация питательных сред

Со момента появления первых сообщений, посвященных культивированию клеток, тканей или органов вне живого организма, исследователей занимал вопрос о составе питательной среды, достаточном для поддержания жизнеспособности клеток и возможности их пролиферации [1–3]. И несмотря на огромный выбор коммерческих сред и добавок для выращивания клеток в искусственных условиях, проблема выбора питательной среды до сих пор не утратила актуальности [4–6].

Классически питательные среды, используемые для культивирования клеток животных, подразделяют на естественные (или природные) и искусственные (или синтетические). *К естественным питательным средам* относятся биологические жидкости (плазма, сыворотка, лимфа, сыворотка пуповинной крови человека, амниотическая жидкость), тканевые экстракты (экстракт печени, селезенки, костный мозг, экстракты бычьего и куриного эмбрионов), коагуляты или сгустки плазмы крови. *Искусственные среды* подразделяются на сбалансированные солевые растворы, образующие основу для комплексных сред (фосфатно-солевой буфер – PBS, фосфатный буфер Дульбекко – DPBS, раствор Хэнкса – HBSS, раствор Эрла – EBSS), основные или минимальные среды (MEM, DMEM) и комплексные среды (RPMI-1640, IMDM, F-10 и F-12 Хэма) [1, 6].

Естественные среды очень удобны, эффективны и подходят для культивирования широкого спектра культур клеток животных. Однако основными недостатками таких сред являются низкая воспроизводимость из-за варьирования компонентов в разных партиях и отсутствие информации об их точном составе. Искусственные или синтетические среды получают путем объединения питательных веществ (как органических, так и неорганических), витаминов, солей, сывороточных белков, углеводов, кофакторов. В настоящее время разработаны

различные искусственные среды, обеспечивающие выполнение одной или нескольких задач, таких как поддержание жизнеспособности, длительное культивирование, неограниченный рост культуры или специализированные функции. Клетки животных можно культивировать, используя исключительно естественную питательную среду или искусственную среду с добавлением натуральных компонентов [1, 6].

В зависимости от состава искусственные среды также классифицируют на среды, содержащие сыворотку, бессывороточные среды, безбелковые среды и химически определенные среды.

Бессывороточные среды (serum-free media) были разработаны для устранения недостатков, связанных с влиянием сыворотки на конечный результат эксперимента, например при интерпретации в иммунологических исследованиях [7]. Как правило, они предназначены для культур, состоящих из клеток одного типа (например, Knockout Serum Replacement и Knockout DMEM от Thermo Fisher Scientific для стволовых клеток) и включают определенные количества очищенных факторов роста, протеинов и липопротеинов, источником которых традиционно является сыворотка [8]. Такие среды относятся к «определенным культуральным средам», так как их компоненты известны. В случае, когда бессывороточные среды дополняют фракциями общего белка (бычьего сывороточного альбумина, α - или β -глобулина), они относятся к «химически неопределенным средам» [1, 5].

Безбелковые среды (protein-free media) не содержат высокомолекулярные протеины, но могут включать пептидные фракции (гидролизаты белков) [1]. По сравнению со средами, дополненными сывороткой, применение безбелковых сред способствует активному росту клеток и экспрессии белка, а также облегчает последующую очистку любого экспрессированного продукта, например моноклональных антител [5, 9]. Примерами безбелковых сред могут служить MEM и RPMI-1640, которые при необходимости могут быть дополнены белковыми компонентами.

В состав *химически определенных сред* (chemically defined media) не входят белковые фракции, гидролизаты или экстракты тканей, такие среды включает только химически чистые, не содержащие примеси неорганические и органические компоненты. В их состав могут входить белковые добавки, такие как факторы роста, продуцируемые в бактериях или дрожжах генноинженерным способом с последующим добавлением витаминов, холестерина,

специфических аминокислот и жирных кислот [1, 5, 6].

Некоторые авторы также выделяют среды, не содержащие чужеродных компонентов (xeno-free media или animal-derived component-free media), в состав которых входят только соединения человеческого, но не животного происхождения (например, сывороточный альбумин человека) [10]. При этом среды, не содержащие компоненты животного происхождения, могут включать бактериальные, дрожжевые гидролизаты или растительные экстракты [1, 5].

Компоненты питательной среды

Выбор питательной среды непосредственно влияет на возможность длительного поддержания клеток в культуре, способность клеток активно пролиферировать, экспрессировать целевой продукт или выполнять какую-либо функцию. В связи с этим при планировании эксперимента, а также при подборе питательной среды и условий культивирования необходимо учитывать особенности и функции компонентов, составляющих ее основу, чем и определяется неослабевающий интерес исследователей к потребностям клеток в питательных элементах и к возможности их восполнения культуральной средой [11–13].

Основные компоненты

Состав питательных сред варьирует в зависимости от типа клеток, для культивирования которых среда была разработана, от функционального назначения среды и от представлений ее составителя о потребностях клеток, выращиваемых в искусственных условиях. Однако обязательные компоненты, обеспечивающие жизнеспособность клеток вне живого организма, присутствуют со всех составах коммерческих сред.

Буферная система. Поддержание оптимального уровня pH является обязательным условием культивирования клеток *in vitro*. Наиболее распространенными являются два типа буферных систем – на основе бикарбоната натрия и на основе HEPES.

Бикарбонатная буферная система обеспечивает постоянный уровень pH равновесным соотношением между бикарбонатом натрия (NaHCO_3) в культуральной среде и CO_2 в инкубаторе, при этом она является недорогой и нетоксичной для клеток. В результате повышения концентрации CO_2 в газовой фазе увеличивается количество CO_2 , растворенного в питательной среде, что ведет к росту концентрации H_2CO_3 и понижению pH. Напротив, если концентрация CO_2 газовой фазы снижена, то pH повышается за счет обратной реакции [4, 14]. Как

правило, теоретически оптимальной концентрацией CO_2 в инкубаторе считается 5–6%, однако фактически она должна регулироваться в зависимости от концентрации NaHCO_3 в культуральной среде. Например, уровень CO_2 5% адекватен при содержании в среде 26 ммоль/л NaHCO_3 (среда MEM), 2% CO_2 соответствует 14 ммоль/л NaHCO_3 (среда F-12 Хэма), 10% CO_2 – 44 ммоль/л NaHCO_3 (среда DMEM) [11]. Эти величины являются теоретическими значениями, вычисленными при помощи уравнения Хендерсона – Хассельбаха

$$(\text{pH} = \text{pKa} + \log[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]_{\text{(жидкой фазы)}})$$

где pKa – отрицательный логарифм константы кислотной диссоциации), на практике рекомендуется проверять pH питательной среды после достижения равновесия, а затем корректировать концентрацию CO_2 [1, 15].

HEPES или (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) обладает большей буферной емкостью, чем бикарбонатная система, и обеспечивает стабильный уровень pH среды в диапазоне pH 7,2–7,4 даже в условиях культивирования клеток вне CO_2 инкубатора. Применение HEPES также целесообразно при поддержании культур с высокой плотностью клеток, когда pH быстро снижается вследствие накопления метаболитов, например лактата, и в случае использования бессывороточных сред, лишенных буферного воздействия сыворотки [6, 14]. В то же время буферная система на основе HEPES является более дорогостоящей и может оказывать негативное влияние на определенные типы клеток, такие как эпифизарные хондроциты куриных эмбрионов и эмбриональные стволовые клетки [16]. Также было показано, что HEPES повышает чувствительность среды к фототоксическим эффектам, индуцированным воздействием флуоресцентного света, усиливает генерацию цитотоксичных продуктов, в основном перекиси водорода [17]. Поэтому при использовании буферной системы, основанной на HEPES, следует тестировать воздействие буфера на культивируемые клетки.

Феноловый красный. Большинство предлагаемых коммерческих сред содержат феноловый красный в качестве индикатора pH, что позволяет непрерывно отслеживать уровень кислотности культуральной среды. При низком уровне pH феноловый красный становится желтым, тогда как при высоких уровнях pH он имеет пурпурную окраску, ярко-красный цвет среды соответствует pH 7,4, оптимальному для культивирования клеток животных [1, 11]. Однако добавление индикатора в среды имеет ряд недо-

статков: 1. Феноловый красный имитирует действие стероидных гормонов, например эстрогена, что оказывает влияние на пролиферацию некоторых клеток млекопитающих [18]. 2. Присутствие фенолового красного в ряде бессывороточных композиций нарушает калий-натриевый гомеостаз, однако этот эффект можно нейтрализовать, включив в состав среды сывороточный или бычий гормон гипофиза. 3. Феноловый красный может искажать результаты в исследованиях, основанных на проточной цитометрии. Поэтому при его добавлении в среду следует проверять, оказывает ли он какое-либо воздействие на культивируемые клетки и на эмпирические результаты, особенно при работе с чувствительными к эстрогену клетками, такими как клетки молочной железы [6, 18].

Неорганические соли в средах способствуют поддержанию осмотического баланса и помогают регулировать мембранный потенциал [6]. Основными ионами, входящими в состав культуральных сред являются Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} и HCO_3^- [12]. Кальций ($\sim 10^{-3}$ М) обеспечивает адгезию клеток к субстрату, и в средах, предназначенных для суспензионных культур, его концентрация снижена. Кроме того, он играет роль в сигнальной трансдукции, и концентрация этого иона является определяющей для размножения или дифференцировки клеток. Магний ($\sim 10^{-4}$ М) является ключевым ионом для поддержания активности ряда ферментов, он также влияет на стабильность мембраны. Натрий ($\sim 10^{-1}$ М), калий ($\sim 10^{-3}$ М) и хлорид ($\sim 10^{-1}$ М) ответственны за мембранный потенциал клеток, тогда как анионы фосфата ($\sim 10^{-3}$ М), сульфата ($\sim 10^{-6}$ М) и гидрокарбоната ($\sim 10^{-2}$ М) необходимы для синтеза внеклеточного матрикса и играют роль в регуляции внутриклеточного заряда [4, 14].

Углеводы в форме сахаров являются основным источником энергии для культивируемых клеток. Наиболее распространенным элементом питания в коммерческих средах является глюкоза [11], однако некоторые могут содержать галактозу, мальтозу или фруктозу [4, 6]. В зависимости от метаболической активности клеток и скорости их пролиферации для поддержания культур некоторых типов клеток требуется большее количество питательных веществ. Такие особенности культуры следует учитывать при выборе среды. Например, среда DMEM изначально содержала 5,6 ммоль/л глюкозы, но сейчас для клеток с активным метаболизмом доступен модифицированный вариант с повышенной концентрацией глюкозы, 25 ммоль/л. Однако применение этой среды

для культивирования активно пролиферирующих клеток может приводить к быстрому накоплению в среде таких метаболитов, как лактат (в искусственной среде клетки получают энергию преимущественно за счет гликолиза), что вызывает снижение pH раствора [11]. В данном случае рекомендуется более частая замена среды или использование буферной системы HEPES, обладающей большей буферной емкостью [1].

Аминокислоты входят в состав белков, что определяет их обязательное присутствие во всех средах; они необходимы для пролиферации клеток, поэтому их концентрация определяет максимальную плотность, которую культура может достичь [13, 14]. Так как клетки неспособны синтезировать незаменимые аминокислоты, они должны быть включены в состав питательной среды, в отличие от заменимых аминокислот, которые, как правило, не входят в состав основных сред (BME и MEM). Однако не все типы клеток способны синтезировать достаточное количество заменимых аминокислот в искусственных условиях. Поэтому внесение их в питательную среду (например, среда F-12 Хэма) может обеспечить благоприятные условия для роста и размножения клеток, а также позволяет снизить биосинтетическую нагрузку на клетки, способные синтезировать аминокислоты с необходимой для поддержания жизнедеятельности скоростью. Особое внимание следует уделять аминокислотам с разветвленной цепью, валину, лейцину и изолейцину. Все они относятся к группе незаменимых аминокислот, и для культивирования некоторых типов клеток, включая человеческие фибробласты и клетки мышины миеломы, необходима высокая их концентрация. Для данных культур рекомендуется своевременная замена среды или дополнительное внесение аминокислот в процессе культивирования [1].

Особенно важна для культивируемых клеток такая аминокислота, как *L-глутамин*. Он обеспечивает клетки азотом, необходимым для НАД, НАДФН, биосинтеза нуклеотидов и белков, а также служит дополнительным источником энергии для метаболизма (участвуя в цикле лимонной кислоты) [11, 13]. Потребность клеток в этой аминокислоте в 3–40 раз (в зависимости от типа клеток) превышает потребность в других аминокислотах; добавление глутамина необходимо при культивировании клеток, требовательных к повышенному содержанию питательных компонентов в среде [2]. Однако стоит учитывать, что глутамин стабилен приблизительно в течение 3 недель при 4°C [19] и легко разлагается в среде с об-

разованием аммиака, оказывающего токсическое воздействие на клетки [11, 20, 21], поэтому предпочтительным является добавление глутамин к среде непосредственно перед употреблением или использованием его производных, более устойчивых к деградации, таких как *L*-аланил-*L*-глутамин или глицил-*L*-глутамин [1, 4]. Эти дипептиды, известные также под коммерческим названием GLUTAMAX™, более термостабильны, чем глутамин, и могут выдерживать стерилизацию автоклавированием [22]. В клетках они расщепляются пептидазами, высвобождая глутамин и аланин или глицин, поэтому доступность глутамин зависит от пептидазной активности клеток, что определяет его невысокую внутриклеточную концентрацию и снижает риск образования токсичных количеств аммиака [5]. Таким образом, дипептиды могут заменять глутамин при длительном культивировании медленно растущих клеточных культур.

Витамины необходимы в качестве предшественников различных кофакторов для пролиферации и роста клеток. Витамины группы В наиболее часто вносят в культуральные среды для стимулирования роста [6], витамины С и Е обладают антиоксидантными свойствами [1]. По большей части водорастворимые витамины (В1, В2, В6, В12, С, фолиевая кислота) присутствуют в основных средах [12]; что касается жирорастворимых витаминов (А, D, Е, К), то их состав и количество часто ограничены, в достаточных концентрациях они присутствуют только в сложных средах, таких как среда 199, RPMI 1640 [4, 14]. Основным недостатком добавления витаминов в питательные среды является их нестабильность: витамины А, С, D и Е быстро деградируют при окислении кислородом воздуха, кроме того, витамин С окисляется в результате реакции с микроэлементами, что может сопровождаться генерацией активных форм кислорода. На скорость распада витаминов А, В1, В2, В12, С и К также влияет свет, деградации витаминов В1 и В5 способствует повышение температуры. Фолаты отличаются слабой растворимостью и в некоторых случаях могут быть частично удалены из среды во время стерилизации фильтрацией. Гидрококобаламин и аскорбиновая кислота взаимодействуют, способствуя взаимной деградации [1].

Дополнительные компоненты

Сыворотка животных представляет собой сложный комплекс высокомолекулярных и низкомолекулярных биомолекул с различными, физиологически сбалансированными стимулирующими и ингибиру-

ющими рост активностями [23]. Широкое распространение в технологии культивирования клеток получили сыворотки взрослых (лошадиная сыворотка), новорожденных животных (телячья сыворотка) или эмбриональные сыворотки (эмбриональная или фетальная бычья сыворотка – FBS). Последняя на сегодняшний день является наиболее популярной и повсеместно используемой сывороткой. Эмбриональная бычья сыворотка богата факторами роста и содержит низкий уровень γ -глобулинов (которые обладают ингибирующей рост клеток активностью), поэтому она подходит как для клонирования клеток, так и для поддержания пролиферации клеток, выращивание которых в искусственных условиях вызывает трудности. Телячья сыворотка, напротив, обладает слабой стимулирующей рост активностью, поэтому используется в основном для изучения контактного ингибирования или при исследовании клеточной дифференциации, когда факторы роста могут исказить результат [4, 7]. Еще одна причина, по которой сыворотка теленка может оказаться предпочтительнее эмбриональной сыворотки, это содержание липидов, которое повышается в сыворотке после рождения с течением времени, поэтому при культивировании клеток, требующих высокого содержания липидов, выбирают телячью сыворотку или сыворотку взрослого быка [1]. Лошадиная сыворотка, получаемая от взрослых лошадей, характеризуется сравнительно высокой однородностью разных партий. Она отличается низкой концентрацией полиаминоксидазы [24], участвующей в синтезе полиаминов, которые стимулируют пролиферацию клеток и медленно метаболизируются [1, 25].

Состав сыворотки животного происхождения очень сложен, многообразен и может варьировать в зависимости от лота, партии или фирмы – производителя продукта. К компонентам, идентифицированным в сыворотке, относятся следующие биомолекулы [1, 6, 23]:

– белки, среди которых выделяют сывороточные белки (альбумин, глобулины, в том числе иммуноглобулины), транспортные белки (трансферрин, транскортин, липопротейны $\alpha 1$ и $\beta 1$), ингибиторы протеаз ($\alpha 1$ -антитрипсин и $\alpha 2$ -макроглобулин), факторы прикрепления (фибронектин, ламинин) и факторы распространения, а также ферменты (лактатдегидрогеназа, щелочная фосфатаза, γ -глутамилтрансфераза и др.);

– небелковые соединения, содержащие азот (пурины и пиримидины, аминокислоты, полиамины, креатинин, мочевины);

– углеводы (глюкоза, галактоза, фруктоза, манноза, рибоза);

– гормоны (инсулин, глюкагон, соматотропин, кортикостероиды, тиреоидные и паратиреоидные гормоны, андрогены, эстроген, прогестерон, пролактин, фолликулостимулирующий гормон, вазопрессин, простагландины и др.);

– факторы роста и цитокины (эпидермальный фактор роста – EGF, фактор роста фибробластов – FGF, инсулиноподобный фактор роста – IGF, фактор роста нервной ткани – NGF, фактор роста тромбоцитов – PDGF, трансформирующий фактор роста – TGF, фактор роста эндотелиальных клеток – ECGF, интерлейкины, интерфероны);

– липиды и жирные кислоты, свободные или связанные с белками (холестерин, стероиды, этаноламин, холин, инозитол, фосфолипиды, триглицериды; пальмитат, стеарат, олеат, линолеат и другие);

– витамины (водорастворимые – B1, B2, B6, B12, C, фолиевая кислота, биотин, никотиновая кислота, пантотеновая кислота; жирорастворимые – A, D, E, K);

– микроэлементы (Fe, Zn, Cu, Cr, I, Co, Se, Mn, Mo и др.).

Многокомпонентный состав сыворотки определяет множественность выполняемых ею функций: она обеспечивает клетки элементами питания, стимулирует их рост и пролиферацию, способствует прикреплению к субстрату и распространению по всему объему культурального сосуда; повышая вязкость среды, сыворотка защищает культуру от механических повреждений при перемещении или пипетировании, протеазы обеспечивают защиту клеток от лизиса; кроме того, сыворотка увеличивает буферную емкость среды. Как правило, в питательные среды вносят от 2% до 15% сыворотки [6, 7, 9].

Однако, несмотря на значение сыворотки для поддержания жизнеспособности клеток в искусственных условиях, ее применение имеет ряд недостатков [23, 25, 26], таких как низкая воспроизводимость результатов вследствие варьирования состава разных лотов, возможность присутствия в сыворотке факторов, ингибирующих рост клеток, увеличение риска контаминации (например, вирусами). Также добавление сыворотки может влиять на производимый клетками продукт и препятствовать его дальнейшей очистке [9]. В случаях, когда применение сыворотки является нежелательным, исследователи могут использовать так называемые заменители сыворотки [8, 27]. Они включают экстракты сыворотки, экстракты тканей или гидролизаты [10], в том числе лизаты тромбоцитов факторы роста [28, 29],

гормоны, белки-переносчики (альбумин и трансферрин), липиды, металлы, витамины, полиамины и восстановители (2-меркаптоэтанол, α -тиоглицерин, восстановленный глутатион) [30, 31]. Количество комбинаций этих соединений практически бесконечно, при этом они, как правило, взаимодействуют друг с другом. Их подбор требует огромных усилий, времени и затрат, так как невозможно составить оптимальную среду, добавляя вещества случайным образом и в произвольных комбинациях. Коммерческие бессывороточные и безбелковые среды показывают хорошие результаты при культивировании клеток [32], однако их состав почти никогда не раскрывается и их нельзя отнести к «химически определенным».

Антибиотики в процессе культивирования клеток млекопитающих используются для сдерживания роста бактериальных и грибковых контаминантов, особенно в процессе получения первичных культур [33]. Наиболее распространенными антибиотиками являются: пенициллин (100 ед/мл; ингибирование синтеза клеточной стенки бактерий), стрептомицин (100 мкг/мл; влияние на синтез белка), гентамицин (50 мкг/мл; ингибирование синтеза белка) [4, 19]. Из антимикотиков чаще применяют амфотерицин В (2,5 мкг/мл; нарушение барьерной функции мембраны). Однако регулярное применение антибиотиков может привести к развитию резистентности у бактерий, а также препятствует обнаружению в культуре контаминантных микоплазм [19]. Кроме того, антибиотики могут влиять на метаболизм чувствительных клеток. В связи с этим общей рекомендацией является строгое соблюдение правил асептики и отказ от регулярного использования антибиотиков в рутинных процедурах культивирования клеток [4, 6, 14].

Выбор культуральной среды

Каждый вид питательной среды был разработан для определенного типа клеток, в соответствии с их происхождением (видом животного) и целью культивирования. Среды MEM, DMEM или F-12 Хэма, как правило, применяют для поддержания адгезионных клеточных культур, среду RPMI 1640 – для суспензионных культур. Еще одним значимым вопросом при выборе среды является вопрос о добавлении природных компонентов. Например, MEM (предложенная Иглоу) была разработана с учетом добавления сыворотки и потому содержит только минимально необходимые компоненты (неорганические соли, сахар, незаменимые аминокислоты и водорастворимые витамины), тогда как среда 199 и среда Хэма F-12, предназначенные для культивирования

клеток без сыворотки, имеют более сложный состав. Ниже приведены типы клеток и клеточных линий, для культивирования которых можно использовать наиболее распространенные питательные среды [1, 6]:

MEM (минимальная питательная среда Игла) содержит сбалансированный солевой раствор, заменимые аминокислоты и пируват натрия, подходит для культивирования эмбриональных фибробластов цыплят, клеток яичника китайского хомячка, эмбриональных нервных клеток, альвеолярных клеток, эндотелиальных, эпидермальных клеток, фибробластов, глиальных клеток, клеток глиомы, меланомы, опухолевых клеток человека;

DMEM (модифицированная Дульбекко среда Игла) отличается от *EMEM* более высокой концентрацией аминокислот (примерно в 2 раза) и витаминов (в 4 раза), а также содержит нитрат железа, пируват натрия и несколько дополнительных аминокислот. Данную среду первоначально использовали для культур эмбриональных стволовых клеток мыши, однако впоследствии ее применяли для широкого спектра животных клеток и клеточных линий: для эндотелиальных клеток, эмбриональных альвеолярных клеток, клеток цервикального эпителия, клеток желудочно-кишечного тракта, клеток щитовидной железы свиньи, клеток скелетных мышц, клеток Сертоли, фибробластов сирийского хомяка, клеток мышинной нейробластомы, клеточных линий на основе клеток, полученных от пациентов с раком яичников;

RPMI-1640 (среда, разработанная в Мемориальном институте Розуэлл Парка для лимфоцитов периферической крови) используется для культивирования Т-клеток и тимоцитов, стволовых гемопоэтических клеток, клеток печени крыс, мышинных гибридом, опухолевых клеток человека, линий клеток миелоидной лейкемии и лимфобластного лейкоза человека, клеток миеломы мыши, клеток лейкемии и эритролейкемии мыши.

Комплексные среды F-10 и F-12 Хэма первоначально были созданы для поддержания клонального роста клеток яичника китайского хомяка (СНО), при этом среда Хэма F-12, дополненная 25 мМ *NEPES*, обладает улучшенными буферными свойствами. Данные среды могут применяться для выращивания клеток пигментированной сетчатки куриного эмбриона, клеток костной, хрящевой и жировой тканей, эмбриональных клеток легких, клеток скелетных мышц.

IMDM (среда Дульбекко, модифицированная Исквум) является исключительно обогащенной синтетической средой, подхо-

дящей для быстро пролиферирующих культур клеток с высокой плотностью. Среда представляет собой модификацию *DMEM*, содержащую селен, дополнительные аминокислоты, витамины и неорганические соли, а также *NEPES* и пируват натрия. Среда была разработана для культивирования лимфоцитов и гибридом и может использоваться при культивировании клеток костного мозга, стволовых гематопоэтических клеток, линий клеток лимфобластного лейкоза человека.

Заключение

Выбор питательной среды определяет успех культивирования клеток, выбранных в качестве объекта исследования или модельной системы, возможность поддержания жизнеспособной культуры длительное время и способность клеток активно пролиферировать в искусственных условиях. В настоящее время коммерческое разнообразие доступных сред, готовых к употреблению или нуждающихся в незначительных дополнениях, а также сывороток, факторов роста, гормонов и других активных соединений достаточно велико и, при условии правильного выбора или эмпирического подбора наиболее целесообразных компонентов, позволяет обеспечивать стабильное поддержание множества типов клеток или клеточных линий в культуре.

Список литературы

1. Yao T., Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues *Reprod Med Biol.* 2017. vol. 16. no 2. P. 99–117. DOI: 10.1002/rmb2.12024.
2. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science.* 1955, vol. 122. P. 501–514. DOI: 10.1126/science.122.3168.501.
3. Ham R.G., McKeegan W.L. Media and growth requirements. *Methods Enzymol.* 1979. vol. 58. P. 44–93. DOI: 10.1016/S0076-6879(79)58126-9.
4. Eisenblatter T., Psathaki K., Nitz T., Galla H., Wegener J. Cell culture media: selection and standardization. In: Lehr C.M., ed. *Cell Culture Models of Biological Barriers. In-Vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery.* London: Taylor & Francis, 2002. P. 20–40.
5. Van der Valk J., Brunner D., Smet K. De, Fex Svenningsen E., Honegger P., Knudsen L.E., Lindl T., Noraberg J., Price A., Scarino M.L., Gstraunthaler G. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro.* 2010. vol. 24. P. 1053–1063. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.03.016.
6. Meenakshi A. Cell culture media: a review. *Mater Methods.* 2013. vol. 3. P. 175–203. DOI: 10.13070/mm.en.3.175.
7. Van der Valk J., Bieback K., Buta C., Cochrane B., Dirks W.G., Fu J., Hickman J.J., Hohensee C., Kolar R., Liebsch M., Pistollato F., Schulz M., Thieme D., Weber T., Wiest J., Winkler S., Gstraunthaler G. Fetal bovine serum (FBS): Past – Present – Future. *Altex.* 2018. vol. 35. no. 1. P. 99–118. DOI: 10.14573/altex.1705101.
8. Zhang S., Liu Z., Su G., Wu H. Comparative analysis of KnockOut™ serum with fetal bovine serum for the in vitro long-term culture of human limbal epithelial cells. *J. Ophthalmol.* 2016. vol. 2016. 10 p. DOI: 10.1155/2016/7304812.

9. Butler M. Serum and protein free media. In: Al-Rubeai M. Animal cell culture. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. P. 223–236.
10. Cimino M., Gonçalves R.M., Barrias C.C., Martins M.C.L. Xeno-free strategies for safe human mesenchymal stem/stromal cell expansion: Supplements and coatings. *Stem Cells International*, 2017. vol. 2017. P. 56–68. DOI: 10.1155/2017/6597815.
11. Portner R. Characteristics of mammalian cells and requirements for cultivation. In: Eibl R., Eibl D., Portner R., Catapano G., Czermak P. Cell and tissue reaction engineering. – Verlag, Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. P. 13–53. DOI: 10.1007/978-3-540-68182-3_2.
12. Rodríguez-Hernández C.O., Torres-García S.E., Olvera-Sandoval C., Ramírez-Castillo F.Y., Muro A.L., Avelar-Gonzalez F.J., Guerrero-Barrera A.L. Cell culture: history, development and prospects. *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.* 2014. vol. 2. no. 12. P. 188–200.
13. Oyeleye O.O., Ogundejí S.T., Ola S.I., Omitogun O.G. Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2016. vol. 11. no. 2. P. 6–16. DOI: 10.5897/BMBR2016.0261.
14. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2017. 691 с.
15. Jang J., Moon S.-J., Hong S.-H., Kim I.-H. Colorimetric pH measurement of animal cell culture media. *Biotechnol Lett.* 2010. vol. 32. P. 1599–1607. DOI: 10.1007/s10529-010-0341-6.
16. Poole C.A., Reilly H.C., Flint M.H. The adverse effects of HEPES, TES, and BES zwitterion buffers on the ultrastructure of cultured chick embryo epiphyseal chondrocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1982. vol. 18. P. 755–765. DOI: 10.1007/bf02796499.
17. Zigler J.S. Jr, Lepe-Zuniga J.L., Vistica B., Gery I. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1985. vol. 21. P. 282–287. DOI: 10.1007/BF02620943.
18. Berthois Y., Katzenellenbogen J., Katzenellenbogen B. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1986. vol. 83. P. 2496–500. DOI: 10.2307/27311.
19. Swain P., Nanda P.K., Nayak S.K., Mishra S.S. Basic techniques and limitations in establishing cell culture: A mini review. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2014. vol. 2. P. 1–10. DOI: 10.14737/journal.aavs/2014/2.4s.1.10.
20. Pasieka A., Morgan J. Glutamine metabolism of normal and malignant cells cultivated in synthetic media. *Nature.* 1959. vol. 183. P. 1201–1202. DOI: 10.1038/1831201a0.
21. Schneider M., Marison I.W., von Stockar U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology.* 1996. vol. 46. no. 3. P. 161–185. DOI: 10.1016/0168-1656(95)00196-4.
22. Christie A., Butler M. Growth and metabolism of a murine hybridoma in cultures containing glutamine-based dipeptides. *GIBCO Focus.* 1994. vol. 16. no. 1. P. 9–13.
23. Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffel H., Pfaller W., Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex.* 2010. vol. 27. P. 53–62. DOI: 10.14573/altex.2010.1.53.
24. Freshney R.I. Defined media and supplements. In: Freshney R.I., ed. *Culture of Animal Cells.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2010. P. 99–114.
25. Versteegen R. Serum: What, when, and where? *BioProcessing.* 2016. vol. 15. P. 18–21. DOI: 10.12665/J151.Versteegen.
26. Karnieli O., Friedner O.M., Allickson J.G., Zhang N., Jung S., Fiorentini D., Abraham E., Eaker S.S., Yong T.K., Chan A., Griffiths S., When A.K., Oh S., Karnieli O. A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy.* 2017. vol. 19. no. 2. P. 155–169. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.11.011.
27. Fang C.-Y., Wu C.-C., Fang C.-L., Chen W.-Y., Chen C.-L. Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PLOS ONE.* 2017. vol. 12. no. 6. P. 1–27. DOI: 10.1371/journal.pone.0178960.
28. Mojica-Henshaw M. P., Jacobson P., Morris J., Kelley L., Piercel J., Boyer M., Reems J.-A. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy.* 2013. vol. 15. P. 1458–1468. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.014.
29. Hemedá H., Giebel B., Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2014. vol. 16. P. 170–180. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.11.004.
30. Rauch C., Feifel E., Amann E.M., Spötl H.P., Schennach H., Pfaller W., Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *Altex.* 2011. P. 305–316. DOI: 10.14573/altex.2011.4.305.
31. Piletz J.E., Drivon J., Eisenga J., Buck W., Yen S., McLin M., Meruvia W., Amaral C., Brue K. Human cells grown with or without substitutes for fetal bovine serum. *Cell Medicine.* 2018. vol. 10. P. 1–11. DOI: 10.1177/2155179018755140.
32. Usta S.N., Scharer C.D., Xu J., Frey T.K., Nash R.J. Chemically defined serum-free and xeno-free media for multiple cell lineages. *Ann. Transl. Med.* 2014. vol. 2. no. 10. P. 97–105. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.05.
33. Perlman D. Use of antibiotics in cell culture media. *Methods Enzymol.* 1979. vol. 58. P. 110–116. DOI: 10.1016/s0076-6879(79)58128-2.